

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: G01N 33/48	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/20343 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. Mai 1998 (14.05.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06121 (22) Internationales Anmeldedatum: 5. November 1997 (05.11.97) (30) Prioritätsdaten: 196 45 729.7 6. November 1996 (06.11.96) DE 197 28 991.6 7. Juli 1997 (07.07.97) DE (71) Anmelder, (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): B.R.A.H.M.S DIAGNOSTICA GMBH [DE/DE]; Kom- turstrasse 19-20, D-12099 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LOOS, Ulrich [DE/DE]; Otto Elsässer Weg 9, D-89081 Ulm (DE). MINICH, Waldemar, B. [DE/DE]; Ochsensteige 7, D-89075 Ulm (DE). (74) Anwälte: <u>ANDRAE, Steffen</u> ; Andrae, Flach, Haug, Kneissl, Bauer, Schneider, Balanstrasse 55, D-81541 München (DE) usw.		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: RECEPTOR BINDING ASSAY, APPROPRIATE RECOMBINANT FUSION RECEPTOR FOR SAID ASSAY, VECTOR FOR ITS PRODUCTION AND REAGENT KIT FOR IMPLEMENTING THE RECEPTOR BINDING ASSAY (54) Bezeichnung: REZEPTORBINDUNGSASSAY, FÜR DEN REZEPTORBINDUNGSASSAY GEEIGNETER REKOMBINANTER FUSIONSREZEPTOR, VEKTOR ZU DESSEN HERSTELLUNG SOWIE REAGENZENSATZ FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES REZEPTORBINDUNGSASSAYS (57) Abstract <p>Receptor binding assay to determine TSH receptor autoantibodies in a biological sample, in which a preparation of a recombinant TSH fusion receptor as TSH receptor preparation is used, which is extended by one peptide radical as compared to a functional TSH receptor, wherein said peptide radical (i) has a label or can be selectively labelled and/or (ii) can be immobilized or is immovable by binding with a selective binding partner, for instance a monoclonal antibody, a metal-chelate resin or a biotin-binding protein without significantly impairing the required functionality of the TSH receptor for the receptor binding assay. Further, a recombinant TSH fusion receptor which has the aminoacid sequence of a functional human TSH receptor, which is extended by one peptide radical with the properties cited supra, specially one which has been produced by using a vaccinia virus/HeLa cells expression system.</p> (57) Zusammenfassung <p>Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer biologischen Probe, bei dem man als TSH-Rezeptor-Präparation eine Präparation eines rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors verwendet, der gegenüber einem funktionalen TSH-Rezeptor um einen Peptidrest verlängert ist, wobei dieser Peptidrest (i) eine Markierung aufweist oder selektiv markierbar ist und/oder (ii) durch Bindung an einen selektiven Bindungspartner, z.B. einen monoklonalen Antikörper, ein Metallchelatharz oder ein biotinbindendes Protein, immobilisiert oder immobilisierbar ist, ohne daß die für den Rezeptorbindungsassay erforderliche Funktionalität des TSH-Rezeptors signifikant beeinträchtigt ist. Ferner ein rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor, der die Aminosäuresequenz eines funktionalen humanen TSH-Rezeptors aufweist, die um einen Peptidrest mit den genannten Eigenschaften verlängert ist, insbesondere ein solcher, der unter Verwendung eines Vacciniavirus/HeLa-Zellen-Expressionssystems hergestellt wurde.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

10

**Rezeptorbindungsassay, für den Rezeptorbindungsassay
geeigneter rekombinanter Fusionsrezeptor, Vektor zu dessen
Herstellung sowie Reagenziensatz für die Durchführung des
Rezeptorbindungsassays**

15

20

25

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Rezeptorbindungsassay, insbesondere zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer biologischen Probe, unter Verwendung von rekombinanten Fusionsrezeptoren, die zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern mit Hilfe eines derartigen Assays erforderlichen rekombinanten TSH-Fusionsrezeptoren, einen Vacciniavirus-Vektor zur Herstellung derartiger Fusionsrezeptoren und einen Reagenziensatz (Kit) zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Rezeptorbindungsassays.

30

Es ist bekannt, biologisch aktive Substanzen, deren Anwesenheit und/oder Menge in einer biologischen Probe, und zwar einer flüssigen oder verflüssigten biologischen Probe, gemessen werden soll, mit Hilfe von Bestimmungsverfahren (Assays) zu bestimmen, bei denen spezifische Binder für die zu bestimmende Substanz in Kombination mit weiteren Reagenzien wie markierten Kompetitoren, Immobilisierungsreagenzien, Fällungsreagenzien

- 2 -

und/oder Markierungsreagenzien zum Einsatz kommen. Die bekanntesten derartigen Bestimmungsverfahren sind dabei immundiagnostische Bestimmungsverfahren (Immunoassays), bei denen spezifische Bindungen vom Antigen-Antikörper-Typ genutzt werden. Auch wenn es in Einzelfällen aufgrund der Natur der zu bestimmenden oder als Kompetitoren zu verwendenden Antigenmoleküle nicht einfach sein kann, Bestimmungsverfahren zu entwickeln, die alle Anforderungen für einen Routineeinsatz in der klinischen Praxis erfüllen, so bereitet es doch in der Regel keine grundsätzlichen Schwierigkeiten, derartige Assays so zu gestalten, daß am Ende der Bestimmung ein Reaktionsprodukt, das Markierungsanteile enthält und damit eine Information über die Anwesenheit und/oder Menge der zu bestimmenden Substanz liefert, an eine feste Phase gebunden vorliegt, z.B. an die Wände eines Teströhrchens. Insbesondere ist es in der Regel nicht besonders schwierig, als Bestandteil eines solchen Assays verwendete spezifische Binder vom Antikörpertyp ohne Beeinträchtigung ihrer für das Bestimmungsverfahren wichtigen spezifischen Bindungsfähigkeit direkt oder indirekt zu markieren und/oder zu immobilisieren.

Anders liegen die Verhältnisse im Falle von Rezeptorbindungsassays, d.h. im Falle von Bestimmungsverfahren (Assays), bei denen wenigstens einer der spezifischen Bindungspartner ein Rezeptor ist. Die Bindung von Biomolekülen von peptidischer oder proteinischer Natur, z.B. von Hormonen oder auch Autoantikörpern, an Rezeptoren ist in der Regel sehr komplexer Natur, und die Ausbildung einer spezifischen Bindung zwischen Rezeptor und Biomolekül ist sehr viel empfindlicher gegenüber strukturellen Veränderungen insbesondere des Rezeptors, als das bei einem üblichen Bindungspaar Antigen/Antikörper der Fall ist. Versuche, Rezeptoren zu immobilisieren und/oder zu markieren, führen in der Regel zu strukturellen Veränderungen, die die Funktionalität von Rezeptoren stark beeinträchtigen. Das führt dazu, daß zahlreiche Assay-Grundtypen, die bei Immunoassays unter Ausnutzung einer Antikörper/Antigen-Bindung zur Verfügung stehen, für die Durchführung von Rezeptorbin-

- 3 -

dungsassays in der Praxis nicht genutzt werden können.

5 In dem Patent DE 43 28 070 C1 ist ein Typ eines Rezeptorbindungsassays, der nach der Coated-Tube-Technik arbeitet, beschrieben, bei dem die Schwierigkeit der Herstellung von markierten bzw. immobilisierten funktionalen Rezeptorpräpara-
10 tionen dadurch umgangen wird, daß man an die Festphase Bestandteile eines kompetitierenden Reaktionsystems bindet, das gewissermaßen einen "Schatten" der eigentlichen Rezeptorbindungsreaktion darstellt. Für die Schaffung von Assays für die klinische Routinediagnostik hat sich das offenbarte Verfahrens-
15 prinzip jedoch als zu kompliziert und daher wenig praktikabel erwiesen. Auf die allgemeinen Ausführungen in der genannten Patentschrift zur Problematik von Rezeptorbindungsassays im allgemeinen und von solchen zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern im speziellen wird ergänzend ausdrücklich Bezug
genommen.

20 Aus der EP-B-0 488 170 sind ferner zellfreie Rezeptorbindungstests bekannt, bei denen rekombinante Fusionsrezeptoren aus einem aminoterminalen Rezeptorprotein und einem Trägerprotein, insbesondere dem konstanten Teil (Fc) der schweren Kette eines Immunglobulins, eingesetzt werden, die mittels eines Antiserums
25 oder eines monoklonalen Antikörpers an eine feste Phase gekoppelt sind. Die diskutierten Rezeptoren gehören nicht zur Klasse der hochmolekularen G-Protein gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren. Ferner ist eine Immobilisierung durch Bindung eines Trägerproteins, das der Fc-Teil eines Immunglobulins ist, für
30 Rezeptorbindungsassays, mit deren Hilfe Autoantikörper bestimmt werden sollen, wenig geeignet, da die Autoantikörper selbst zu den Immunglobulinen gehören und mit dem Immobilisierungssystem wechselwirken können.

35 Zu den Rezeptoren, die bisher beim Versuch ihrer Immobilisierung und/oder Markierung in ihrer Funktionalität so beeinträchtigt wurden, daß sie bisher weder in immobilisierter noch in direkt markierter Form für Bestimmungsverfahren vom

- 4 -

Rezeptorbindungsassay-Typ verwendet werden konnten, gehört insbesondere auch der TSH-Rezeptor.

Rezeptorbindungsassays, bei denen als spezifischer Binder TSH-Rezeptor-Präparationen verwendet werden, bilden den eigentlichen Schwerpunkt der vorliegenden Erfindung. Das schließt es jedoch nicht aus, daß die nachfolgend präsentierten Erkenntnisse und vorteilhaften Ergebnisse, die mit modifizierten TSH-Rezeptoren gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, auf andere Fälle direkt übertragen werden können, insbesondere auf solche Fälle, bei denen Rezeptoren verwendet werden, die dem gleichen Substanztyp angehören wie der TSH-Rezeptor.

Der TSH-Rezeptor ist ein in der Schilddrüsenmembran lokalisierter Rezeptor, an den das von der Hypophyse ausgeschüttete Hormon TSH (Thyroid-stimulierendes Hormon oder Thyreotropin) bindet und dadurch die Ausschüttung der eigentlichen Schilddrüsenhormone, insbesondere des Thyroxins, auslöst. Der TSH-Rezeptor gehört zur Rezeptor-Familie der G-Protein-gekoppelten Glykoprotein-Rezeptoren mit einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, zu der auch der LH/CG- und der FSH-Rezeptor gehören. Eine Aufklärung der chemischen Struktur des TSH-Rezeptors, d.h. der Sequenz der für ihn codierenden DNA sowie der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz des Rezeptors selbst, gelang Ende 1989 (vgl. Libert F. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1250-1255; Nagayama Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1184-1190; vgl. auch EP-A-0433509 bzw. WO-A-91/09121; sowie WO-A-91/09137; WO-A-91/10735 und WO-A-91/03483; ferner Yuji Nagayama & Basil Rapoport, in: Molecular Endocrinology, Vol. 6 No. 2, S. 145-156 und die darin zitierte Literatur). Mit der Verfügbarkeit der für den humanen TSH-Rezeptor codierenden cDNA gelang die Expression des rekombinanten humanen TSH-Rezeptors in einer Vielzahl verschiedener Expressionssysteme. Dabei zeigte es sich, daß ein funktionaler humaner TSH-Rezeptor voller Länge anscheinend nur in Säugerzellen exprimiert werden kann, und zwar sowohl transient als auch in Form stabiler Zelllinien (vgl. z.B. Loos, U. et al.

- 5 -

in: Eur. J. Biochem. 232, S. 62-65 (1995); oder Matsuba T. et al., J. Biochem. 118, S. 265-270 (1995) und darin zitierte Literatur).

5 Gegen den TSH-Rezeptor können Autoantikörper gebildet werden, die für verschiedene Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind, wobei sogenannte stimulierende Autoantikörper, die zu einer als Morbus Basedow (englisch: Graves' disease) bekannten Schilddrüsenüberfunktion führen, für die klinische Diagnostik
10 besonders wichtig sind. Ein zur Bestimmung derartiger Autoantikörper im Handel befindlicher bekannter Assay ist der TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH.

15 Zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern wird nach dem herkömmlichen Verfahren so vorgegangen, daß man die zu bestimmenden Autoantikörper aus einer Serumprobe in flüssiger Phase mit einem radioaktiv markierten bovinen TSH-Kompetitor um die Bindungsstellen eines Detergens-solubilisierten porcinen TSH-Rezeptors konkurrieren läßt (vgl. Southgate, K. et al.,
20 Clin. Endocrinol. (Oxford) 20, 539-541 (1984); Matsuba T. et al., a.a.O.; Produktinformation zum TRAK-Assay® der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH). Um das an die Rezeptor-Präparation gebundene markierte TSH zu bestimmen, wird nach Abschluß der Inkubation der TSH-Rezeptor mit einem Fällungsreagens und
25 einem anschließenden Zentrifugierschritt von der flüssigen Phase abgetrennt. Die Bestimmung des Rezeptor-gebundenen markierten TSH erfolgt durch Messung der im Sediment gebundenen Radioaktivität.

30 Durch die Verfügbarkeit von rekombinanten humanen TSH-Rezeptor-Präparationen hat sich an diesem Assay-Design nichts geändert. Soweit die in den verschiedenen Expressionssystemen erhaltenen rekombinanten humanen TSH-Rezeptoren überhaupt funktionale Rezeptoren waren, wurden die daraus gewonnenen TSH-Rezeptor-
35 Präparationen in ähnlicher Weise in solubilisierter Form eingesetzt wie eine herkömmliche porcine TSH-Rezeptor-Präparation. Außerdem wurde zu wissenschaftlichen Zwecken die

- 6 -

Funktionalität der exprimierten Rezeptoren auch an den ganzen transformierten Zellen gemessen.

Die Freisetzung der rekombinanten humanen TSH-Rezeptoren aus
5 den Wirtszellen, z.B. CHO- oder COS-Zellen, mit Hilfe von
Detergenzien erwies sich aufgrund der Wachstumseigenschaften
derartiger Zellen als schwierig und war von einer teilweisen
proteolytischen Spaltung des rekombinanten Rezeptors begleitet,
und die erhaltenen Präparationen waren ebensowenig ohne
10 Funktionalitätsverlust immobilisierbar oder markierbar wie die
bisherigen, aus biologischem Material gewonnenen TSH-Rezeptor-
Präparationen, so daß durch die Verwendung rekombinanter TSH-
Rezeptor-Präparationen keine Änderungen des traditionellen
Bestimmungsverfahrens ermöglicht wurden. Die Notwendigkeit, bei
15 allen bisher bekannten Verfahren einen Fällungs- und Zen-
trifugationsschritt durchzuführen, belastet jedoch die
Routinebestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern im klini-
schen Laboralltag, und außerdem ist sie ein Hindernis für eine
Automatisierung derartiger Bestimmungen, z.B. unter Verwendung
20 von an sich bekannten automatischen Meßsystemen.

Im Rahmen der vorliegenden Anmeldung wird unter einem "funktio-
nalen Rezeptor" ein Rezeptor verstanden, der die für die
Durchführung eines Rezeptorbindungsassays erforderliche
25 Funktionalität aufweist, d.h. die Eigenschaft, sowohl den
Kompetitor, in der Regel TSH, als auch die gesuchten Auto-
antikörper zu binden. Die Fähigkeit zur cAMP-Stimulation ist
demgegenüber ohne größere Bedeutung. Wenn ferner davon
gesprochen wird, daß die Funktionalität des TSH-Rezeptors durch
30 einen zusätzlichen Peptidrest und/oder durch Immobilisierung
bzw. Markierung nicht beeinträchtigt ist, bedeutet das nicht,
daß Eigenschaften wie z.B. Bindungsaffinitäten in jeder
Hinsicht, insbesondere in quantitativer Hinsicht, mit den
entsprechenden Eigenschaften von Vergleichsrezeptoren natürli-
chen oder rekombinanten Ursprungs identisch sein müssen.
35 Abweichungen bei Eigenschaften, die sich nicht entscheidend auf
das für die Praxis wichtige Verhalten der Rezeptorpräparation

- 7 -

in einem der nachfolgend geschilderten Rezeptorbindungsassay auswirken, sind nicht als "Beeinträchtigung" anzusehen. Ein funktionaler Rezeptor kann die vollständige Aminosäuresequenz eines natürlich vorkommenden Rezeptors enthalten, eine funktionale Teilsequenz davon oder eine Sequenz oder Teilsequenz, bei der ein Teil der natürlich vorkommenden Aminosäuren durch andere ersetzt oder weggelassen ist oder diese durch Einschübe getrennt sind, wenn dadurch die wie oben definierte Funktionalität nicht beeinträchtigt wird.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Rezeptorbindungsassay, insbesondere einen Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern, zu schaffen, bei dem mit einem funktionalen Rezeptor, insbesondere TSH-Rezeptor, gearbeitet werden kann, der immobilisierbar und/oder markierbar ist, so daß Verfahrens-Grundtypen, bei denen mit immobilisierten oder markierten spezifischen Bindern gearbeitet wird, auch für Rezeptorbindungsassays zur Anwendung gelangen können.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die dafür erforderlichen funktionalen Rezeptorpräparationen und die Mittel zu deren Herstellung zu schaffen.

Schließlich ist es auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Reagenziensätze (Kits) zu schaffen, die die für Rezeptorbindungsassays neuartigen Bestimmungsverfahren verkörpern, insbesondere solche, bei denen die Coated Tube-Technik bzw. Mikrotiterplatten-Technik für den Bereich der Rezeptorbindungsassays zur Anwendung kommt.

Diese Aufgaben werden bei einem Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern in einer biologischen Probe, insbesondere einem Humanserum, und zwar entsprechend einer allgemeinen Definition derartiger Rezeptorbindungsassays im weitesten Sinne gemäß Oberbegriff von Patentanspruch 1, dadurch gelöst, daß man als TSH-Rezeptor-Präparation eine Präparation eines rekombinanten TSH-Fusions-

- 8 -

rezeptors, insbesondere eines rekombinanten humanen TSH-Fusionsrezeptors, verwendet, der gegenüber dem entsprechenden natürlich vorkommenden funktionalen TSH-Rezeptor, insbesondere gegenüber dem natürlich vorkommenden funktionalen TSH-Rezeptor
5 voller Länge oder einem funktionalen Fragment davon, um einen endständigen oder als Einschub vorhandenen Peptidrest verlängert ist, wobei dieser Peptidrest (i) eine Markierung aufweist oder selektiv markierbar ist und/oder (ii) durch Bindung an einen immobilisierten selektiven Bindungspartner
10 immobilisiert oder immobilisierbar ist, ohne daß die Funktionalität des TSH-Rezeptors beeinträchtigt ist.

Vorteilhafte Ausgestaltungen eines derartigen Rezeptorbindungsassays sind den Unteransprüchen 2 bis 13 zu entnehmen bzw.
15 ergeben sich für den Fachmann aus den nachfolgenden Erläuterungen.

Die Erfindung betrifft ferner für derartige erfindungsgemäße Rezeptorbindungsassays erforderliche rekombinante TSH-Fusionsrezeptoren gemäß Anspruch 14 bzw. den Unteransprüchen 15 bis
20 19 und einen für die Herstellung eines solchen rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors in Warmblüterzellen geeigneten Vacciniavirus-Vektor gemäß den Ansprüchen 20 bis 22.

Die Erfindung betrifft ferner in verallgemeinerter Form auch Rezeptorbindungsassays nach Anspruch 23 und den Unteransprüchen
25 24 und 25.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch einen Reagenziensatz (Kit) gemäß Anspruch 26, der als einen Bestandteil
30 eine Festphase, insbesondere Coated Tubes, mit einem daran immobilisierten funktionalen Fusionsrezeptor enthält.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß es möglich ist, ohne Funktionalitätsverlust am C-Terminus um einen Peptidrest verlängerte funktionale Rezeptoren vom Typ des TSH-Rezeptors
35 herzustellen und daß derartige Fusionsrezeptoren ohne Funktio-

- 9 -

nalitätsverlust an spezifische Binder für den Peptidrest gebunden werden können, die immobilisiert oder immobilisierbar oder markiert oder markierbar sind.

- 5 Die im Rahmen der vorliegenden Anmeldung als "Peptidrest" bezeichnete Aminosäuresequenz, die einen natürlich vorkommenden funktionalen Rezeptor, insbesondere einen Rezeptor voller Länge oder ein funktionales Fragment davon, z.B. den Rezeptor ohne einen Teil seines C-Terminus, in seiner Sequenz oder insbesondere an seinem C-Terminus verlängert, ist vorrangig
10 dadurch gekennzeichnet, daß zu dieser Sequenz ein selektiver Bindungspartner verfügbar ist, der an die genannte Sequenz bindet, ohne einerseits die Rezeptorfunktionalität zu beeinträchtigen und ohne andererseits mit den restlichen Komponenten eines Rezeptorbindungsassays, d.h. im Falle eines Rezeptorbindungsassays zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern mit den zu bestimmenden Autoantikörpern und/oder dem Kompetitor, z.B. ¹²⁵TSH, störende Wechselwirkungen einzugehen.
- 20 "Peptidrest" ist dabei in einem weiten Sinne ohne Einschränkung auf kurzkettige typische "Peptide" zu verstehen und umfaßt auch Aminosäureketten mit Peptidbindung, die dem Bereich der Oligopeptide oder Polypeptide bzw. sogar Proteine zugeordnet werden können. So soll die Definition z.B. noch einen Avidinrest (512 Aminosäuren, Molekulargewicht 66.000) und einen
25 Streptavidinrest (Molekulargewicht ca. 60.000) umfassen, die selektive sehr feste Bindungen zu Biotin als selektiven Bindungspartner eingehen, d.h. Peptide mit bis zu etwa 600 Aminosäureresten. Die bevorzugten Peptidreste sind jedoch
30 kürzer, wobei diese Peptidreste, gegebenenfalls neben zusätzlichen, auch als Spacer zum eigentlichen Rezeptormolekül dienenden Aminosäuresequenzen, das sogenannte FLAG-Epitop und/oder einen Peptidrest aus sechs Histidinresten (6His-Rest) umfassen können. Das sogenannte FLAG-Epitop ist ein Markerpeptid der Struktur N-Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys-C. Ein für
35 die Expression dieses Markerpeptids verwendbarer Expressionsvektor sowie monoklonale Antikörper, die das genannte FLAG-

- 10 -

Epitop erkennen, sind kommerziell erhältlich (für Deutschland von der Firma Integra Biosciences GmbH). Auf das Prospektmaterial zum IBI-FLAG®-System wird ergänzend bezug genommen.

5 Der als weiterer Rest erwähnte 6His-Peptidrest (auch als "6His affinity tag" bekannt) ist ebenfalls Teil eines bekannten kommerziellen Peptid-Marker- und Reinigungssystems. Der 6His-Peptidrest geht eine sehr feste Komplexbindung mit Metallatomen, insbesondere Nickelatomen, ein, wobei dann, wenn diese
10 Nickelatome durch Chelatisierung fest an ein Trägerharz gebunden sind, eine sehr feste Bindung eines Proteins oder Peptids mit dem 6His-Peptidrest an das entsprechende Trägerharz erhalten wird. Ein bevorzugtes Trägerharz ist dabei das sogenannte Ni-NTA-Harz, das (für Deutschland) vertrieben wird
15 von der Qiagen GmbH und dessen Struktur und Verwendung beschrieben wird in der Patentschrift EP-B-0 253 303. NTA steht dabei für ein an eine Trägerharzmatrix bindbares Nitrilotriessigsäurederivat. Die Verwendung von Metallchelatharzen in der Immundiagnostik zur Herstellung von Festphasen wie z.B.
20 beschichteten Teströhrchen (Coated Tubes) gehört nicht zu den üblichen Verwendungen derartiger Harze.

Ein weiterer bevorzugter immobilisierbarer und/oder markierbarer Peptidrest für die erfindungsgemäßen TSH-Fusionsrezeptoren ist ein Peptidrest, der eine Aminosäuresequenz, z.B. eine
25 Teilsequenz eines Biotin-Enzyms, umfaßt, die posttranslational biotinylierbar ist, so daß die in einem geeigneten Expressionssystem hergestellten TSH-Fusionsrezeptoren direkt in biotinylierter Form erhalten werden können. Eine bevorzugte derartige
30 Aminosäuresequenz eines Biotin-Enzyms ist die C-terminale Domäne einer Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit (BCCP-Untereinheit) eines Biotin-Enzyms, insbesondere die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit einer prokaryontischen Acetyl-CoA-Carboxylase, insbesondere derjenigen von E. coli. Es zeigte
35 sich, daß die genannte BCCP-Untereinheit postranslational mit hoher Ausbeute biotinyliert wird, und zwar nicht nur in

- 11 -

Prokaryontenzellen, sondern auch in Warmblüterzellen wie z.B. HeLa-Zellen, was nicht unbedingt erwartet werden konnte. Es können auf diese Weise direkt biotinylierte funktionale TSH-Fusionsrezeptoren erhalten werden.

5

Der biotinylierte TSH-Fusionsrezeptor ermöglicht eine spezifische, sensitive und leichte direkte Detektion durch seine Markierung mit radioaktivem Biotin oder eine indirekte Detektion durch Umsetzung mit Avidin oder Streptavidin, die ein detektierbares Label enthalten, z.B. eine radioaktive Markierung oder einen Teil eines enzymatischen und Chemiluminiszenz-Nachweissystems oder andere geeignete Fusionsprodukte davon.

10

Wie nachfolgend und insbesondere im experimentellen Teil beschrieben ist, zeigte es sich, daß es in einem geeigneten Expressionssystem möglich ist, einen rekombinanten TSH-Rezeptor herzustellen, der an seinem C-Terminus um einen Peptidrest, im speziellen Falle ein FLAG-Epitop und einen endständigen 6His-Rest oder einen biotinylierten Peptidrest, verlängert ist, ohne daß durch die genannte endständige Verlängerung des TSH-Rezeptors zu einem TSH-Fusionsrezeptor seine Funktionalität beeinträchtigt wird.

15

20

Als Expressionssystem hat sich ein Expressionssystem als geeignet erwiesen, bei dem rekombinante Vacciniaviren in Warmblüterzellen zur Expression des TSH-Fusionsrezeptors verwendet werden. Die Verwendung von Vacciniaviren als Vektoren ist lange bekannt (vgl. z.B. J.D. Watson et al., Rekombinierte DNA, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, S. 206; D.R. Glick et al., Molekulare Biotechnologie, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, S. 234f.; Kieny M.P. et al., Nature, Vol. 312, S. 163-166, 1984; Moss B., Science 252, S.1662-1667, 1991). Die Einführung von DNA-Sequenzen, die für ein gewünschtes Peptid oder Protein kodieren, in das Genom des Vacciniavirus mittels geeigneter Plasmide ist ebenfalls grundsätzlich bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ein Vacciniavirus-Vektor jedoch erstmals dazu verwendet, ein

25

30

35

- 12 -

Protein aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Glycosidrezeptoren mit einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne in tierischen Zellen zu exprimieren. Als tierische Zellen wurden HeLa-Zellen verwendet, die große Mengen des humanen TSH-Fusionsrezeptors erzeugten. HeLa-Zellen weisen gegenüber den in der Literatur beschriebenen COS7-Zellen oder CHO-Zellen den Vorteil auf, daß sie schnell in hoher Dichte sowohl in einer Trägerkultur als auch in einer Suspensionskultur gezüchtet werden können.

Die im experimentellen Teil näher beschriebene Herstellung des rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors läßt sich kurz wie folgt zusammenfassen: Die TSH-Rezeptor-cDNA wurde in die DNA des Genoms des Vacciniavirus in Analogie zu einer vorbekannten Arbeitsweise (Kieny, M.P. et al., Nature, 312, S. 163-166 (1984)) eingeführt. Die Fremdgene benötigen für eine wirksame Transkription virale Promotoren. Das verwendete Rekombinations-Plasmid p7.5K131 enthält den Early/Late-Promotor 7.5K des Vacciniavirus, flankiert von den Vacciniavirus-Thymidinkinase(TK)-Sequenzen, um die Rekombination in den TK-Ort des viralen Genoms zu dirigieren. Das Rekombinations-Plasmid wurde so konstruiert, daß in den erhaltenen rekombinanten Viren das TSH-Rezeptor-cDNA-Segment strangabwärts von der 5'-untranslatierten Leadersequenz des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) flankiert ist. Diese Sequenz stammte aus dem pTM1-Vektor und erhöht die Wirksamkeit der mRNA-Translation in Zellen, die mit dem Vacciniavirus infiziert waren (Moss, B. et al., Nature, 348, S.19-92, (1990)). Rekombinante Viruskclone mit der EMCV-Leader-Sequenz erzeugten sehr viel mehr TSH-Rezeptor als solche ohne diese Sequenz (Daten nicht gezeigt). Der rekombinante TSH-Rezeptor enthielt ferner das FLAG-Oktapeptid-Epitop, das von kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern erkannt wird, sowie ein 6His-Peptid an seinem Carboxyl-Terminus. Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthielt der rekombinante TSH-Fusionsrezeptor eine biotinylierte Peptidsequenz, und zwar die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der Acetyl-CoA-Carbox-

- 13 -

ylase von E.coli.

Das obengenannte Rekombinations-Plasmid p7.5K131 ist unter der Bezeichnung pAvB2 beschrieben in einer Doktorarbeit (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg) von Herrn Albrecht von Brunn aus dem Jahre 1989 mit dem Titel "Das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus als Trägersystem von Epitopen eines Merozoiten-Oberflächenmoleküls des Malaria-Erregers Plasmodium falciparum - eine neue Möglichkeit der Impfstoffentwicklung?". Die Verwendung des konkreten Plasmids ist nicht kritisch, und es kann stattdessen auch mit einem anderen Vektor gearbeitet werden, der ein Thymidinkinase-Gen und den sog. 7.5K-Promotor enthält, z.B. mit dem Vektor pZVneo5529, der beschrieben ist in C. Bouvier et al., European Journal of Pharmacology, Molecular Pharmacology Section 290 (1995), S.11-17.

Rekombinante Virus-Klone wurden durch Western-Blot-Analyse des TSH-Rezeptors, der in infizierten HeLa-Zellen exprimiert wurde, identifiziert.

Der mit Hilfe des Vacciniavirus-Vektors in HeLa-Zellen hergestellte TSH-Fusionsrezeptor erwies sich als vollständig funktional im Hinblick auf die TSH-Bindung. Infizierte HeLa-Zellen wiesen hochaffine TSH-Bindungsstellen auf, wobei die Bindungsaffinität derjenigen des nicht-rekombinanten TSH-Rezeptors in humanen Schilddrüsenzellen sowie in FRTL5-Zellen bemerkenswert ähnlich ist. Es erwies sich ferner, daß der TSH-Rezeptor aus infizierten HeLa-Zellen durch das nicht-ionische Detergens Triton® X100 in wirksamer Weise extrahiert werden kann. Die durch Extraktion erhaltene Fusionsrezeptor-Präparation ist sowohl im Hinblick auf die Bindung von TSH als auch von Morbus Basedow-Autoantikörpern aktiv. Die Verlängerung des natürlich vorkommenden funktionalen TSH-Rezeptors um einen Peptidrest, im vorliegenden Falle das FLAG-Epitop und den 6His-Peptidrest oder die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase von E.coli, beeinträchtigte weder die

- 14 -

Fähigkeit zur Bindung des TSH-Hormons noch zur Bindung von Autoantikörpern, und der TSH-Fusionsrezeptor war auch im Hinblick auf die TSH-stimulierte cAMP-Produktion voll funktionsfähig.

5

Mit dem rekombinanten Vacciniavirus infizierte HeLa-Zellen produzierten erhebliche Mengen an humanem TSH-Fusionsrezeptor, und zwar in einer Größenordnung von bis zu 150.000 funktionellen Rezeptormolekülen pro Zelle. Dieser Wert ist höher als die für die meisten bekannten Expressionssysteme beschriebenen Werte und vergleichbar mit dem, der von Matsuba et al., J.Biochim. 118, S. 265-270 (1995) beschrieben wird.

10

Die in den folgenden Beispielen an den TSH-Rezeptor angefügten Peptidreste können als Modelle für markierbare und immobilisierbare Peptidreste angesehen werden, ohne daß die Erfindung auf die genannten konkreten Reste beschränkt sein soll. Über das FLAG-Epitop kann der rekombinante TSH-Fusionsrezeptor unter Verwendung von spezifischen verfügbaren monoklonalen Antikörpern immobilisiert, jedoch auch spezifisch markiert werden. Über den 6His-Peptidrest kann der TSH-Fusionsrezeptor ebenfalls ohne Verlust seiner Funktionalität an einer Festphase immobilisiert werden und steht damit für Rezeptorbindungsassays zu Verfügung, die Verfahrensvarianten verwirklichen, die für solche Assays bisher nicht genutzt werden konnten. Über das nach der Biotinylierung kovalent an den exprimierten BCCP-Peptidteil gebundene Biotinmolekül ist ebenfalls eine Markierung und/oder Immobilisierung des entsprechenden Fusionsrezeptors möglich.

20

25

30

35

So ergeben sich aufgrund der Verfügbarkeit eines immobilisierbaren und/oder markierbaren funktionalen TSH-Rezeptors sowie unter Berücksichtigung der Konkurrenz und damit bis zu einem gewissen Grad auch gegenseitigen Ersetzbarkeit von TSH und TSH-Rezeptor-Antikörpern beispielsweise die folgenden Verwirklichungsmöglichkeiten für einen erfindungsgemäßen Rezeptorbindungsassay.

- 15 -

1. Der Fusionsrezeptor wird über seinen Peptidrest und einen spezifischen immobilisierten Bindungspartner an einer Festphase, z.B. den Wänden von Coated Tubes, immobilisiert, und die Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern erfolgt analog zum vorbekannten Verfahren durch deren Konkurrenz mit markiertem TSH um die Bindungsstellen des Rezeptors.
2. Dieses Reaktionsschema kann jedoch auch umgekehrt werden, indem man TSH an einer Festphase immobilisiert und das immobilisierte TSH mit den zu bestimmenden Autoantikörpern um einen über den Peptidrest markierten TSH-Fusionsrezeptor konkurrieren läßt. Die Markierung kann beispielsweise mit Hilfe eines markierten monoklonalen Antikörpers erfolgen, der spezifisch an den Peptidrest bindet. Die Menge der über das immobilisierte TSH an die Festphase gebundenen Markierung ist hierbei umgekehrt proportional zur Konzentration der Autoantikörper in der Probe.
3. Wie oben unter 1. wird mit einem immobilisierten TSH-Rezeptor gearbeitet, wobei man als Kompetitor jedoch nicht markiertes TSH verwendet, sondern markierte monoklonale oder polyklonale TSH-Rezeptor-Antikörper, die mit den zu bestimmenden Autoantikörpern um die Bindungsstellen des immobilisierten Rezeptors konkurrieren.
4. Analog zu der unter 2. beschriebenen Verfahrensvariante kann anstelle von TSH auch ein TSH-Rezeptor-Antikörper immobilisiert werden.
5. Ein an einer Festphase immobilisierter TSH-Rezeptor kann dazu verwendet werden, die in einer Probe vorhandenen TSH-Rezeptor-Autoantikörper vollständig zu binden, die dann anschließend durch ein geeignetes Markierungsreagens, das auf Antikörper anspricht, z.B. ein Antiserum oder Protein A in markierter Form, markiert werden können.

- 16 -

6. Eine weitere Verfahrensvariante stellt die Umkehrung der unter 5. beschriebenen Verfahrensvariante dar, indem zuerst mit Hilfe geeigneter spezifischer oder auch unspezifischer Binder die Autoantikörper in der Probe an eine Festphase gebunden und anschließend mit Hilfe eines markierten TSH-Rezeptors markiert werden.

7. Ferner kann das Bestimmungsverfahren auch zur Bestimmung spezieller, zwei Rezeptor-bindende Epitope aufweisender Autoantikörper dienen, indem man mit einem an einer Festphase immobilisierten Rezeptor und einem löslichen markierten Rezeptor arbeitet und die Menge an Markierung an der Festphase bestimmt, die auf eine Bindung der zu bestimmenden Autoantikörper sowohl durch den immobilisierten als auch den markierten Rezeptor zurückgeht.

Weitere an sich bekannte Assaydesigns, z.B. solche mit einer stufenweisen Inkubation und einer Differenzmessung, sind dem Fachmann ohne weiteres bekannt.

Als Antikörper können bei diesen Assaydesigns geeignete monoklonale und polyklonale Antikörper, insbesondere auch humane monoklonale und humane polyklonale Antikörper, sowie rekombinante Antikörperkonstrukte, z.B. sogenannte Single-Chain-Antikörper, verwendet werden. Es ist ferner möglich, auch geeignete Antikörperfragmente einzusetzen, insbesondere auch zur Rezeptormarkierung.

Die Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen funktionalen Fusionsrezeptoren macht es auch möglich, neue definierte monoklonale Antikörper gegen den rekombinanten funktionalen TSH-Fusionsrezeptor zu erzeugen, die gegen Teile der Rezeptorsequenz und angrenzende Teile des angehängten Peptidrests, z.B. das FLAG-Epitop und/oder einen Teil des 6His-Peptids, gerichtet sind, und die aufgrund ihrer Spezifität weitere neue Anwendungsmöglichkeiten und Vorteile für die Assaygestaltung erschließen. Weitere Informationen zur Durchführung und zu den Vorteilen der

- 17 -

vorliegenden Erfindung ergeben sich für den Fachmann aus dem nachfolgenden experimentellen Teil unter Bezugnahme auf die Figuren. In den Figuren zeigen:

- 5 Figur 1: den zeitlichen Verlauf der TSH-Rezeptor-Expression in HeLa-Zellen. In Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen wurden HeLa-Monolayer-Zellen mit einer Plaque-bildenden Einheit des rekombinanten Vaccinia-virus pro Zelle infiziert. 0, 2, 4, 6, 8, 14 und 24
10 h nach der Infektion wurden die Zellen entnommen, mittels SDS-Page aufgetrennt, und der TSH-Rezeptor wurde durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die Molekülgrößenmarker sind in kDa angegeben.
- 15 Figur 2: die Bindung von ^{125}I -TSH an Extrakte von infizierten HeLa-Zellen als Funktion der Infektionszeit. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung der Bestandteile des TRAK-Assays[®] in einem Gesamtvolumen von 100 μl gemäß Gebrauchsanweisung.
- 20 Figur 3: die Verteilung des rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors auf unterschiedliche Zellfraktionen, die aus infizierten HeLa-Zellen erhalten wurden. In der Darstellung stellt Bande 1 einen Markerextrakt von
25 HeLa-Zellen dar, Bande 2 repräsentiert die wasserlösliche Cytoplasmafraktion, Bande 3 den unter Verwendung von Triton[®] X100 erhaltenen Membranextrakt, Bande 4 das verbleibende, mit Triton[®] X100 nicht extrahierbare unlösliche Protein. Die Molekülgrößenmarker sind wiederum in kDa angegeben.
30
- 35 Figur 4: eine Scatchard-Darstellung der ^{125}I -TSH-Bindung an mit dem rekombinanten Vacciniavirus infizierten HeLa-Zellen.
- Figur 5: die Analyse von Autoantikörpern in unfraktionierten Seren von Morbus Basedow-Patienten im Vergleich mit

Kontrollseren von Normalpatienten. Die Wirkung von sechs Kontrollseren und 13 Seren von Morbus Basedow-Patienten auf die Bindung von ^{125}I -TSH an den rekombinanten TSH-Rezeptor im Extrakt aus infizierten HeLa-Zellen wurde im Vergleich mit dem porcinen TSH-Rezeptor (aus dem TRAK-Assay[®] Kit) untersucht. Die Ergebnisse sind angegeben als Prozentsatz der Gesamtbindung, wobei eine 100%ige Bindung für die ^{125}I -TSH-Bindung in Gegenwart eines Nullstandard-Serums steht. Die Ergebnisse sind als Durchschnittswerte von Doppelbestimmungen angegeben.

Figur 6: eine Standardkurve, wie sie unter Verwendung des an Ni-NTA-Agarose gekoppelten TSH-Fusionsrezeptors und TRAK-Assay[®] Standards erhalten wird.

Figur 7: die Meßergebnisse für die Bestimmung der TSHr-Autoantikörper-Titer von Morbus Basedow-Patienten und einer Kontrollgruppe unter Verwendung von an Ni-NTA-Agarose gekoppeltem rekombinantem TSH-Fusionsrezeptor; und

Figur 8: die für Normalpatienten und Morbus Basedow-Patienten erhaltenen Meßergebnisse in einer vergleichenden graphischen Gegenüberstellung.

Experimenteller Teil

Materialien

Bovines ^{125}I -TSH (56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), unmarkiertes TSH sowie der TRAK-Assay[®]-Kit wurden von der Fa. B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH zur Verfügung gestellt. Der pTM1-Vektor wurde von den Doktoren R.E. Rhoads und B. Joshi (Louisiana State University Medical Center, Shreveport, USA) bezogen, der p7.5K131-Rekombinationsvektor wurde von Dr.T.Mertens (Universität Ulm, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der BIOTRAK[®] cAMP [^{125}I]-Assay-Kit und der

- 19 -

ECL®-Western-Blot-Nachweis-Kit wurden von der Fa. Amersham bezogen. Die monoklonalen Mäuse-Antikörper NCL-TSHR gegen die extrazelluläre Domäne des TSH-Rezeptors wurden von der Fa. Novocastra Laboratories Ltd. bezogen. Proteaseninhibitorcocktail-Tabletten wurden von der Fa. Boehringer Mannheim bezogen. Die DNA-Primer P1 bis P5 wurden von der Fa. Eurogentec bezogen. Sie wiesen die folgenden Nucleotidsequenzen auf:

P1: 5' - GCT GCT GTC ATG TGA AGA TCT ACA TCA CAG TCC GAA ATC
CGC AGT ACA ACC CAG G - 3'

10 P2: 5' - CGC GGA TCC TTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAA
AAC CGT TTG CAT ATA C - 3'

P3: 5' - CGC GGA TCC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTT GTC ATC
GTC GTC CTT G - 3'

P4: 5' - GTA ACC CGA GTC CCG TGG ATC ATG AGG CCG G - 3'

15 P5: 5' - GGG CAG TGA CAC TGG TTT GAG ACA CGT CCA G - 3'

Das pSK1-Plasmid, das eine Sequenz für die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP) Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase von E.coli enthielt, war ein Geschenk von Dr. J. Gelles (Dept. of Biochemistry, Brandeis University, 415 South Street, Waltham, MA 02254; vgl. Lit. Berliner et al. in J. Biol. Chem. 269: Seite 8610-8615, 1994). Die Primer P10 und P11 wiesen die folgenden Nucleotidsequenzen auf:

25 P10: 5' - GTC GGT TAC CAT GGA AGC GCC AGC AGC AG - 3 und

P11: 5' - CGC GGA TCC TTA TTC GAT AAC AAC AAG CGG TTC - 3'.

Sie wurden ebenfalls von der Firma Eurogentec bezogen.

Soweit für einzelne Reagenzien keine Bezugsquellen angegeben werden, wurden allgemein frei erhältliche Handelsprodukte verwendet, bei denen die Bezugsquellen für die Nacharbeitbarkeit keine Bedeutung haben. Soweit ferner nachfolgend für einzelne Reaktionsschritte keine speziellen Reaktionsbedingungen angegeben sind, wurde unter den fachnotorisch bekannten Bedingungen gearbeitet, z.B. bei den für die jeweiligen Restriktionsenzyme angegebenen optimalen Temperaturen und Reaktionszeiten.

- 20 -

Zellkultur

HeLa-Zellen wurden in Eagle's-Medium (modifiziert nach Dulbecco) gezüchtet, das mit 10% fötalem Kälberserum ergänzt war, das 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C unter einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

A. Herstellung und Prüfung eines FLAG-6HIS-TSH-Fusionsrezeptors**Herstellung eines um das FLAG-Octapeptid-Epitop sowie eine 6His-Peptidsequenz verlängerten TSH-Rezeptors**

1. Insertion von Sequenzen für das FLAG-Epitop sowie eine 6His-Peptid-Sequenz in eine TSH-Rezeptor-cDNA-Sequenz

Eine vollständige humane TSH-Rezeptor-cDNA (Libert et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1250-1255, (1989)) wurde nach einer vorbeschriebenen Technik im pSVL-Vektor subkloniert (pSVL-TSHR-Plasmid). P1- und P2-Primer wurden dazu verwendet, das von kommerziell erhältlichen Antikörpern erkannte FLAG-Octapeptid-Epitop (N-Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys-C; vgl. Prospekt IBI FLAG® SYSTEM der Fa. INTEGRA Biosciences) am C-Terminus des TSH-Rezeptors einzuführen. Das 0,5 kb Bgl II-Bam HI-Fragment der TSH-Rezeptor-cDNA wurde auf herkömmliche Weise durch PCR (Polymerase Chain Reaction) unter Verwendung von thermostabiler Taq-DNA-Polymerase vervielfältigt. Der P1-Primer enthält eine Bgl II-Restriktionsstelle, der P2-Primer enthält die FLAG-Epitop-Sequenz (unterstrichen), gefolgt von einem Stopcodon und einer Bam HI-Restriktionsstelle. Das PCR-Fragment wurde mit Bgl II und Bam HI geschnitten und dazu verwendet, das gleiche Fragment in der TSH-Rezeptor-cDNA in dem pSVL-TSH-Plasmid zu ersetzen. Das erhaltene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pSVL-TSHR-FLAG.

P1- und P3-Primer wurden dann verwendet, um das 6His-Peptid direkt nach der FLAG-Epitop-Sequenz am C-Terminus des TSH-

- 21 -

Rezeptors einzuführen. Das 0,5 kb Bgl II-Bam HI-Fragment der TSH-Rezeptor-cDNA in dem pSVL-TSHR-FLAG-Plasmid wurde nach der PCR-Technik vervielfältigt. Der P1-Primer enthält eine Bgl II-Restriktionsstelle, der P3-Primer enthält die Sequenz für das 6His-Peptid, gefolgt von einem Stopcodon und einer Bam HI-Restriktionsstelle. Das PCR-Fragment wurde mit Bgl II und Bam HI geschnitten und dazu verwendet, das entsprechende Fragment in der TSH-Rezeptor-cDNA im pSVL-TSHR-FLAG-Plasmid zu ersetzen. Der erhaltene Vektor erhielt die Bezeichnung pSVL-TSHR-FLAG-6His. Die Nukleotidsequenz der verlängerten cDNA wurde nach dem Sanger-Verfahren bestätigt.

2. Konstruktion eines pTM1-TSHR-FLAG-6His-Expressionsplasmids

Das TSHR-FLAG-6His-DNA-Segment wurde in den pTM1-Vektor (vgl. Moss et al., Nature, 348, S.19-92, (1990)) strangabwärts von der nicht translatierten Encephalomyocarditisvirus (EMCV)-Leadersequenz, die den Wirkungsgrad der mRNA-Translation erhöht, inseriert. Die Nco I-Schnittstelle im pTM1-Vektor enthält das Translations-Initiations-Codon, das für die Insertion des 5'-Endes der für das Protein codierenden cDNA genutzt werden sollte.

P4- und P5-Primer wurden dazu verwendet, eine Schnittstelle für die Rca I-Restriktase im Startcodon-Bereich der TSH-Rezeptor-cDNA im pSVL-TSHR-FLAG-Plasmid zu erzeugen. Diese Schnittstelle ist mit der Nco I-Restriktionsstelle im pTM1-Plasmid kompatibel. Das 0,7 kb Ava I-Afl III-Fragment der TSH-Rezeptor-cDNA wurde durch PCR vervielfältigt, wobei das pSVL-TSHR-FLAG-6His-Plasmid als Matrize diente. Der P4-Primer enthält Ava I- und Rca I-Restriktionsstellen, der P5-Primer enthält die Afl III-Restriktionsstelle. Das PCR-Fragment wurde mit Ava I und Afl III geschnitten und dazu verwendet, das gleiche Fragment in der TSH-Rezeptor-cDNA im pSVL-TSHR-FLAG-6His-Plasmid zu ersetzen. Aus diesem Plasmid wurde die verlängerte 2,3 kb TSH-Rezeptor-cDNA mit den Sequenzen für das FLAG-Epitop und das 6His-Peptid mit Rca I und Bam HI freigesetzt und im pTM1-

- 22 -

Plasmid an den Nco I- und Bam HI-Schnittstellen strangabwärts von der EMCV-Leader-Sequenz subkloniert. Das erhaltene Konstrukt erhielt die Bezeichnung pTM1-TSHR-FLAG-6His. Die Nukleotidsequenz wurde nach dem Sanger-Verfahren bestätigt.

5

3. Konstruktion eines Vaccinia-Rekombinations-Plasmids p7.5K131-TSHR-FLAG-6His

10

Das pTM1-TSHR-FLAG-6His-Plasmid wurde durch Schneiden mit der Cla I-Restriktase linearisiert und zur Ausbildung stumpfer Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach einer Bam HI-Spaltung wurde das TSHR-FLAG-6His-DNA-Segment, das strangaufwärts von der untranslatierten EMCV-Leadersequenz flankiert wurde, isoliert und an Hind II- und Bam HI-Schnittstellen in den Vaccinia-Rekombinationsvektor p7.5K131 subkloniert. Das erhaltene Konstrukt erhielt die Bezeichnung p7.5K131-TSHR-FLAG-6His.

15

4. Erzeugung von Vacciniavirus-Rekombinanten

20

Die TSH-Rezeptor-cDNA unter Kontrolle des 7.5K-Early/Late-Promotors wurde durch homologe Rekombination in das Thymidinkinase (TK)-Gen des Genoms des Wildtyp-Vacciniavirus-Stamms Copenhagen inkorporiert (vgl. Kieny, M.P. et al., Nature 312, S.163-166, (1984)). Kurz gesagt, wurden zu diesem Zwecke konfluente CV1-Zellen mit dem temperaturempfindlichen Vacciniavirus ts7 infiziert und mit Vacciniavirus-DNA (Stamm Copenhagen) und dem p7.5K131-TSHR-FLAG-6His-Konstrukt nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Viren wurden zwei Tage später geerntet, die TK-negativen Rekombinanten wurden aus dem Virusabkömmling in zwei Durchgängen einer Plaque-Reinigung über TK⁻ 143B-Zellen in Gegenwart von 0,1 mg/ml Bromdesoxyuridin selektiert. Rekombinante Virus-Plaques wurden isoliert, und positive Klone wurden nach Expression in infizierten HeLa-Zellen durch Western-Blot-Analyse auf TSH-Rezeptor identifiziert.

25

30

35

- 23 -

Die Proteine wurden dazu einer SDS-Gelelektrophorese auf einem 8% Auflösungs-Polyacrylamidgel (PAG) unterzogen (vgl. Laemmli, U.K., Nature, 227, S. 680-685 (1970)). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, unspezifische Bindungsstellen wurden innerhalb 1 h durch Inkubation mit TBS/5% Trockenmilch/0,02% Tween® 20-Lösung abgesättigt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C durch Umsetzung mit dem monoklonalen NCL-TSHR-Antikörper als Sonde für den TSH-Rezeptor behandelt, der 1:20 verdünnt war. Gebundene Antikörper wurden unter Verwendung des ECL® Western-Blot-Nachweis-Kits nachgewiesen.

Eine größere Vorratsmenge des rekombinanten Virus wurde in HeLa-Zellen hergestellt.

5. Expression des verlängerten TSH-Rezeptor-Polypeptids in HeLa-Zellen und Erzeugung von Zellfraktionen

HeLa-Monolayer-Zellen in 75 cm²-Schalen (etwa 15·10⁶ Zellen) wurden mit einer Plaque-bildenden Einheit (1 pfu) von rekombinantem Vacciniavirus pro Zelle infiziert und 24 h bei 37°C inkubiert. Infizierte Zellen wurden mit PBS gewaschen, geerntet und bei 1200 U/min pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,3 ml eines Puffers resuspendiert, der 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 10% Glycerol sowie eine Proteaseinhibitoren-Mischung enthielt. Die Suspension wurde durch 20 Takte in einem Glas-Teflon-Homogenisator weiter homogenisiert und dann 15 min bei 800 g und 1 h bei 30.000 g zentrifugiert. Der Überstand (wasserlösliche Cytoplasmafraktion) wurde gesammelt. Das Membran-Pellet wurde mit 0,3 ml 1% Triton® X100 im gleichen Puffer extrahiert und bei 30.000 g 1 h ultrazentrifugiert. Der Überstand (Triton® X100-Membranextrakt) wurde gesammelt, das Pellet (unlösliches Protein) wurde in 0,3 ml eines SDS Elektrophoreseproben-Puffers resuspendiert. Die Menge des TSH-Rezeptors in 10 µl einer jeden Fraktion wurde durch Western-Blot-Analyse abgeschätzt.

- 24 -

Die Kinetik der TSH-Rezeptor-Produktion in HeLa-Zellen nach Infektion mit dem rekombinanten Vacciniavirus bei einer Multiplizität der Infektion von 1 ist in Fig. 1 gezeigt. Die Zellen wurden zu Zeitpunkten zwischen 0 und 24 h nach der Infektion gesammelt, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit kommerziell erhältlichen monoklonalen NCL-TSHR-Antikörpern gegen den TSH-Rezeptor markiert. Das rekombinante Protein erschien 6 h nach der Infektion, und die Menge des Proteins erhöhte sich bis zu einem Zeitpunkt von 24 h nach der Infektion, wobei zu diesem Zeitpunkt die Zellen noch relativ gesund sind. Eine Inkubation für einen längeren Zeitraum führte zu einer Zellablösung und ihrem Tod. Eine Western-Blot-Analyse der infizierten Zellen zeigt verschiedene Formen des Rezeptors mit Molmassen von 230 bis 50 kDa, wobei die Hauptfraktion eine Molmasse von etwa 95 kDa aufwies. Das Ergebnis entspricht den aus der Literatur bekannten Daten (Ban T. et al., Endocrinology 131, S.815-829 (1992)). Im Falle der Infektion von HeLa-Zellen mit dem Wildtyp-Vacciniavirus war keinerlei Signal nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Verteilung des erzeugten TSH-Rezeptors auf unterschiedliche Fraktionen, die aus infizierten HeLa-Zellen erhalten wurden, ist in Fig. 3 gezeigt. In der wasserlöslichen Cytoplasma-Fraktion (Bande 2) ist nur eine geringe Menge des Rezeptors nachweisbar. Der Hauptteil des TSH-Rezeptors liegt in der Membran-Fraktion vor, aus der er mit Triton® X100 in wirksamer Weise extrahiert werden kann (Bande 3). Ein Teil des Rezeptors in der Membran-Fraktion wurde nur durch SDS solubilisiert (Bande 4). Dabei kann es sich um einen nicht extrahierbaren TSH-Rezeptor handeln, der fest in die Membranstruktur integriert ist.

Um zu testen, ob eine Abhängigkeit der Ausbeute des TSH-Rezeptors von der Intensität der Infektion besteht, wurde die TSH-bindende Aktivität von Zellen, die mit einer Infektions-Multiplizität von 1 sowie von 10 infiziert wurden, gemessen. Eine Erhöhung der Infektions-Multiplizität von 1 auf 10 erhöhte

- 25 -

die Endausbeute des funktionalen TSH-Rezeptors bis zu 24 h nach der Infektion nicht.

Bindungsassay für ^{125}I -TSH und Morbus Basedow-Autoantikörper

5

HeLa-Zellen in einer 75 cm²-Schale (etwa $15 \cdot 10^6$ Zellen) wurden mit 1 bzw. 10 Plaque-bildenden Einheit(en) des rekombinanten Vacciniavirus pro Zelle infiziert und 24 h bei 37°C inkubiert. Infizierte Zellen wurden mit PBS gewaschen, geerntet und bei 1200 U/min pelletiert. Die erhaltenen Zellen wurden in 0,3 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 1% Triton® X100, 10% Glycerol), der mit Proteaseinhibitoren versetzt war, lysiert. Die Suspension wurde bei 30.000 g 1 h zentrifugiert, und der Überstand lieferte die TSH-Rezeptor-Präparation.

15

Der Assay wurde unter Verwendung von Komponenten des TRAK-Assay®-Kits in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt, das sich aus 25 µl Lösung des rekombinanten TSH-Rezeptors (etwa 200 µg Gesamtprotein), 25 µl entweder Nullstandard-Serum oder Test-Serum sowie 50 µl einer ^{125}I -TSH-Lösung (20.000 cpm) zusammensetzte. Im Einklang mit den Herstelleranweisungen wurde 2 h inkubiert. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 1 ml eines Fällungsmittels gemäß Gebrauchsanweisung gestoppt. Die Röhrchen wurden bei 2000 g 10 min zentrifugiert, und der Überstand wurde entfernt. Die Gammastrahlung im Pellet wurde gemessen. Ergebnisse werden entweder ausgedrückt als gebundene Radioaktivität (in cpm - counts per minute) oder als Prozentsatz der Gesamtbindung, und zwar berechnet nach [(counts in Gegenwart des Test-Serums)/(counts in Gegenwart des Nullstandard-Serums)] · 100%. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-7} M TSH bestimmt und betrug etwa 10% der Gesamtbindung.

25

30

35

Der in den HeLa-Zellen erzeugte TSH-Rezeptor erwies sich im Hinblick auf der Bindung von TSH als voll funktionsfähig. Fig.2 zeigt die Bindung von ^{125}I -markiertem TSH mit Extrakte von infizierten HeLa-Zellen als Funktion der Zeit der Infektion. Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen der TSH-Rezeptor-

- 26 -

Expression in HeLa-Zellen und der TSH-bindenden Aktivität der Zellextrakte (Fig. 1 und 2).

Scatchard-Analyse der TSH-Bindung an infizierte HeLa-Zellen

5 HeLa-Zellen in Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen (etwa 300.000 Zellen/Vertiefung) wurden mit einer Plaque-bildenden Einheit pro Zelle entweder des rekombinanten Vacciniavirus oder des Wildtyp-Vacciniavirus infiziert und 24 h bei 37°C inkubiert. Infizierte Zellen wurden 3 h bei 37°C in 0,2 ml modifiziertem Hank's-Puffer ohne NaCl inkubiert, wobei die Isotonie der Lösung durch 280 mM Saccharose, die mit 0,25% Kälberserumalbumin ergänzt war, gewährleistet wurde. Unterschiedliche Mengen von (a) ^{125}I -markiertem TSH oder (b) einer Mischung von ^{125}I -TSH (25.000 cpm) mit variierenden Konzentrationen von unmarkiertem TSH wurden diesem Puffer zugegeben. Am Ende der Inkubationsperiode wurden die Zellen schnell mit 1 ml des gleichen Puffers gewaschen und mit 1 ml 1N NaOH solubilisiert, und die Radioaktivität wurde in einem Gamma-Counter gemessen. Die spezifische TSH-Bindung wurde definiert als Unterschied zwischen der Gesamtbindung von ^{125}I -TSH in Abwesenheit sowie in Gegenwart von 10^{-7} M TSH. Die unspezifische Bindung betrug etwa 2% der Gesamtbindung. Die Dissoziationskonstante für die TSH-Bindung wurde nach dem Scatchard-Verfahren errechnet (Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 600-672, (1949)). Kontrolluntersuchungen betrafen die Bindung von ^{125}I -TSH an HeLa-Zellen, die mit dem Vacciniavirus vom Wildtyp infiziert waren.

30 Die Wechselwirkung von mit dem rekombinanten Virus infizierten HeLa-Zellen mit ^{125}I -markiertem TSH führte zu einer spezifischen und sättigbaren Bindung des Hormons. Die nach dem Scatchard-Verfahren erhaltenen Daten sind in Fig. 4 aufgetragen. Die Tatsache, daß die Scatchard-Kurve in Fig. 4 eine gerade Linie ist, weist auf die Existenz von nur einem Typ von Bindungsstellen hin. Aus der Steigung der Kurve kann eine Dissoziationskonstante von etwa $2 \cdot 10^{-10}$ M errechnet werden. HeLa-Zellen,

- 27 -

die mit dem Wildtyp-Vacciniavirus infiziert worden waren, zeigten keinerlei nachweisbare spezifische TSH-Bindung (Daten nicht gezeigt). Unter Zugrundelegung der Avogadro-Zahl errechnet sich eine Anzahl von etwa 150.000 hochaffinen TSH-Rezeptoren pro Zelle.

Wechselwirkung des TSH-Rezeptors mit Morbus Basedow-Autoantikörpern

Der durch Expression des rekombinanten Vacciniavirus erhaltene rekombinante TSH-Rezeptor wurde auch auf seine Fähigkeit untersucht, in Seren von Patienten mit Morbus Basedow mit TSH-Rezeptor-Autoantikörpern zu wechselwirken. Die Anwesenheit derartiger Autoantikörper läßt sich anhand ihrer Fähigkeit nachweisen, die Bindung von ^{125}I -TSH an den TSH-Rezeptor zu inhibieren. Dabei ist die Menge der Autoantikörper in dem untersuchten Serum der gemessenen gebundenen Radioaktivität umgekehrt proportional. Mit dem TRAK-Assay®-Kit wurden Seren von sechs gesunden Individuen sowie von 13 Morbus Basedow-Patienten mit unterschiedlichen Autoantikörper-Spiegeln gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt. Sie zeigen, daß der durch Expression des rekombinanten Vacciniavirus in HeLa-Zellen erhaltene verlängerte TSH-Fusionsrezeptor von Morbus Basedow-Autoantikörpern spezifisch erkannt wird. So wurde bei den Autoantikörper-freien Kontrollseren eine 95-106%ige Bindung von ^{125}I -TSH erhalten, während bei der Messung von Seren von Morbus Basedow-Patienten nur eine 30-75%ige entsprechende Bindung erhalten wurde. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante positive Korrelation zu den mit dem TRAK-Assay® Kit erhaltenen Werten.

Intrazelluläre cAMP-Messungen

HeLa Monolayer-Schichten in Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen wurden mit einer Plaque-bildenden Einheit pro Zelle von entweder dem rekombinanten Vacciniavirus oder dem Wildtyp-Vacciniavirus infiziert und 24 h bei 37°C inkubiert. Infizierte

- 28 -

Zellen wurde 1 h in modifiziertem Hank's-Puffer ohne NaCl (vgl. oben) inkubiert und dann eine weitere Stunde im gleichen Puffer, der 1mM Isobutylmethylxanthin sowie vorgegebene Konzentrationen an TSH enthielt. Zelluläres cAMP wurde mit 65% Ethanol extrahiert und unter Verwendung des BIOTRAK® cAMP-Assay-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers gemessen. Kontrolluntersuchungen betrafen die Messungen der TSH-abhängigen cAMP-Produktion in HeLa-Zellen, die mit dem Wildtyp-Vacciniavirus infiziert waren. Es zeigte sich, daß die Einwirkung von TSH eine maximal ca. 6fache dosisabhängige Erhöhung der cAMP-Produktion bewirkte. Mit dem Wildtyp-Vacciniavirus infizierte HeLa-Zellen reagierten nicht. Somit erwies sich der rekombinante TSH-Fusionsrezeptor auch als funktional im Hinblick auf die Stimulation der intrazellulären cAMP-Produktion.

Herstellung eines immobilisierten funktionalen rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors

Mit dem rekombinanten Vacciniavirus infizierte HeLa-Zellen wurden nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C wie weiter oben beschrieben geerntet. Das erhaltene Zellpellet (etwa $2 \cdot 10^8$ Zellen) wurden anschließend in 3 ml Puffer (10 mM Tris pH 7,6; 50 mM NaCl; 1 % Triton® X-100; 10 % Glycerol) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die solubili-sierte Membranfraktion durch Zentrifugation (15 min bei 1000 g und 30 min bei 30.000 g) angereichert und von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt.

Parallel dazu wurden 200 µl Ni-NTA-Agarose (bezogen von der Fa. Qiagen GmbH) mit 200 µl des gleichen Puffers versetzt und in eine kleine offene Säule gepackt.

Der von unlöslichen Bestandteilen befreite Zentrifugationsüber-stand wurde auf die Säule aufgetragen und über Nacht bei 4°C rezirkuliert, um den TSH-Fusionsrezeptor über seinen terminalen 6His-Peptidrest an die Ni-NTA-Agarose zu koppeln.

- 29 -

Die beladene Ni-NTA-Agarose wurde anschließend mit 3 ml Vollblut abgesättigt (Hämoglobin bindet unspezifisch an Ni-NTA-Agarose), um die verbliebenen Ni-NTA-Bindungsstellen abzusättigen. Nach Entfernen des Säulenüberstands wurde die so behandelte Ni-NTA-Agarose mit dem beschriebenen Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml gebracht und in Portionen von 25 µl auf Eppendorf-Teströhrchen verteilt.

Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern unter Verwendung des immobilisierten TSH-Fusionsrezeptors

In die vorausgehend beschriebenen Eppendorf-Teströhrchen mit je 25 µl Ni-NTA-Agarose mit dem daran gebundenen TSH-Fusionsrezeptor wurden zu Meßzwecken jeweils 25 µl eines Serums bzw. 25 µl der Standardlösungen aus dem TRAK-Assay® zugegeben, mit dem Inhalt des Teströhrchens vermischt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden pro Teströhrchen 50 µl Tracer (¹²⁵-TSH aus dem TRAK-Assay®) zugegeben, und unter ständigem Schütteln wurde über Nacht bei 4°C weiter inkubiert.

Anschließend wurden die Röhrchen kurz bei Raumtemperatur zentrifugiert (1 min), 80 µl des Überstands wurden entfernt, und das Zentrifugationspellet wurde in 350 µl Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden 320 µl des Überstands wiederum abpipettiert, und das erhaltene gewaschene Pellet wurde direkt in einem Gammacounter gemessen.

Bei der Messung der Standards aus dem TRAK-Assay® wurden die in Tabelle 1 wiedergegebenen Ergebnisse erhalten. Die zugehörige Standardkurve ist in Fig. 6 gezeigt.

Die Patientenserum wurden jeweils in Doppelbestimmungen gemessen, wobei aus den Einzelmeßwerten Mittelwerte gebildet wurden, die in Tabelle 2 eingegangen sind. Zum Vergleich wurden die gleichen Seren mit dem herkömmlichen TRAK-Assay® gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 2 aufge-

- 30 -

führt. Fig. 7 zeigt die Korrelation der nach dem herkömmlichen TRAK-Assay® erhaltenen Meßwerte zu den Meßwerten, die unter Verwendung des immobilisierten rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors erhalten wurden.

5

Fig. 8 zeigt die Ergebnisse der Messungen von Seren von Normalpatienten und Morbus Basedow-Patienten in einer graphischen Darstellung. Die Gruppe der Morbus Basedow-Patienten läßt sich klar von der Gruppe der Normalpatienten unterscheiden.

10

Es zeigt sich somit, daß es erstmals gelungen ist, die Bestimmung von TSH-Rezeptor Autoantikörpern, wie sie für den Morbus Basedow charakteristisch sind, und unter Verwendung eines funktionalen immobilisierten TSH-Rezeptors durchzuführen.

15

- 31 -

Tabelle 1

5

Standardkurve unter Verwendung eines Ni-NTA-Agarose-gekoppelten rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors

10	STANDARD (aus TRAK-Assay®)	Konzentration	CPM	B/B0
	S0	0	2103,1	100
	S1	5	1957,3	93,1
	S2	15	1727,6	82,1
15	S3	45	1419,8	67,5
	S4	135	899,4	42,8
	S5	405	564,5	26,8

20

Tabelle 2

Vergleichende Bestimmung von TSH-Rezeptor-Autoantikörpern unter Verwendung des TRAK-Assay® sowie unter Verwendung des immobilisierten rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors

30	Morbus Basedow Patienten		Kontrollgruppe	
	TRAK	rek. TSHr	TRAK	rek. TSHr
	176,5	772,3	5,1	5,3
	149,3	1164,8	1,1	6,7
35	38,6	73,9	6,0	9,2
	55,1	96,6	1,8	8,3
	24,3	53,6	4,7	4,8
	79,6	237,6	5,2	6,8
	104,6	385,2	3,9	8,7
40	142,4	359,1	3,1	6,8
	189,0	1529,5	3,6	5,2
	360,7	1788,3	3,3	6,6
	22,6	67,7	1,1	7,1
	133,4	627,4	7,6	6,5
45	81,7	168,7	3,4	8,2
	100,2	668,8	3,7	6,9
	121,9	771,2	5,8	1,5
	45,1	142,4	1,8	5,7
	16,0	18,9	1,5	5,5
50	23,7	97,2	5,2	3,8
			2,5	7,1
			4,5	5,5
			5,1	7,7
			2,5	6,2
55			3,4	5,8
			5,5	4,4

**B. Herstellung und Prüfung eines biotinylierten TSH-Fusions-
rezeptors (TSHR-BIO)**

**5 Herstellung eines um biotinylierte BCCP-Sequenzen verlängerten
TSH-Rezeptorfragments**

1. Anfügung von BCCP-Sequenzen an eine TSH-Rezeptor cDNA

10 Es wurde mit einem Plasmid pSK1 gearbeitet, das die Sequenz für
die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-
Carboxyl-Carrier-Protein (BCCP) Untereinheit einer prokaryonti-
schen Acetyl-CoA-Carboxylase, und zwar der aus E.coli, enthält.
15 Diese Sequenz wurde auf an sich bekannte Weise (vgl. auch oben
unter A.1.) nach der PCR-Technik unter Verwendung der Primer
P10 (der eine Stelle für die Restriktase BstEII enthält) und
P11 (der ein Stopcodon und eine Stelle für die Restriktase
BamHI enthält) vervielfältigt, wobei ein BstEII/BamHI PCR-
20 Fragment erhalten wurde. Das Plasmid p7,5K131-TSHR-FLAG-6HIS
(vgl. oben A.3.) wurde mit den Restriktasen BstEII und BamHI
geschnitten. Dabei wurde ein BstEII/BamHI-Fragment erhalten,
das auch 39 Aminosäuren vom C-Terminus der cDNA des TSH-
Rezeptors enthielt. Dieses BstEII/BamHI-Fragment wurde aus dem
25 letztgenannten Plasmid entfernt und durch das o.g. BstEII/-
BamHI-PCR-Fragment ersetzt, und es wurde auf diese Weise das
neue Plasmid p7,5K131-TSHR-BIO erhalten.

Die relevante Nukleotidsequenz wurde nach dem Sanger-Verfahren
bestätigt. Das erhaltene Plasmid enthält die Sequenz für die
30 N-terminalen 725 Aminosäuren des humanen TSH-Rezeptors (ohne
die eine C-terminale Teilsequenz des natürlichen Rezeptors, der
in vollständiger Form 764 Aminosäuren umfaßt) in Verknüpfung
mit der 87 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Domäne der
Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der Acetyl-CoA-
35 Carboxylase von E.coli.

2. Erzeugung von Vacciniavirus-Rekombinanten

Die TSHR-BIO cDNA unter der Kontrolle des p7,5 Early/Late-Promotors wurde in das Genom des Vacciniavirus-Stammes Copenhagen vom Wildtyp durch homologe Rekombination in das Thymidinkinase (TK) Gen eingefügt (Metzger et al, 1994). Kurz gesagt wurden konfluente CV1 Zellen mit dem temperaturempfindlichen Vaccinia-Virus ts7 infiziert und mit Vaccinia-Virus DNA und dem p7,5K131-TSHR-BIO-Konstrukt nach dem Calciumphosphat-Verfahren transfiziert. Die Viren wurden 2 Tage später geerntet, und die TK-negativen Rekombinanten wurden aus dem Stammvirus in zwei Durchgängen einer Plaque-Reinigung auf TK⁻143B-Zellen in Gegenwart von 0,1 mg/ml Bromdesoxyuridin selektiert. Rekombinante Virus-Plaques wurden isoliert, und positive Klone wurden wie oben unter A.4. durch Western Blot-Analyse auf den TSH-Rezeptor identifiziert. Die für die Bindungstests benötigten größeren Mengen des Virus wurden in HeLa-Zellen hergestellt.

3. Herstellung des TSH-Rezeptor-Extrakts

Konfluente HeLa-Zellen in einer 75 cm²-Platte wurden mit 1 pfu rekombinantem Vaccinia-Virus pro Zelle infiziert und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Infizierte Zellen wurden mit PBS gewaschen, geerntet und bei 1200 U/min pelletiert. Die erhaltenen Zellen wurden in 0,3 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM NaCl, 1 % Triton X100, 10 % Glycerol, Protease-Inhibitoren) einer Lyse durch Einfrieren/Auftauen und eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C unterzogen. Die Suspension wurde bei 30.000 g für 1 Stunde zentrifugiert, und der Überstand (etwa 8 mg/ml Gesamtprotein) lieferte die TSH-Rezeptor-Präparation.

Bindungsassay für ¹²⁵I-TSH und Morbus Basedow-Autoantikörper

Unfraktionierte Seren von gesunden Individuen und Patienten mit Basedow-Schilddrüsenüberfunktion verschiedenen Grades wurden

- 34 -

zur Untersuchung der Bindung von Autoantikörpern an den biotinylierten TSH-Rezeptor verwendet. Der Bindungsassay wurde in einem Gesamtvolumen von 210 μ l durchgeführt, das sich aus 50 μ l TSH-Rezeptorextrakt, 50 μ l entweder Nullstandardserum oder Testserum, 10 μ l Streptavidin-Agarose im Gleichgewicht mit Puffer A und 100 μ l 125 -TSH (etwa 20.000 cpm) zusammensetzte. Die Mischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur unter anhaltendem Durchmischen inkubiert, mit 0,3 ml Puffer A unter Zentrifugation gewaschen, und die Gammastrahlung im Pellet wurde gezählt. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10^{-7} M TSH bestimmt, und sie betrug weniger als 10 % der Gesamtbindung.

Kontrollmessungen, die die Bindung von 125 -I-TSH und von Patienten-Autoantikörpern an einen solubilisierten porcinen TSH-Rezeptor betrafen, wurden unter Verwendung des TRAK Assay® (Brahms Diagnostica GmbH) im Einklang mit den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Ergebnisse

Es wurde gezeigt, daß die verwendete C-terminale prokaryontische BCCP-Domäne eine effektive posttranslationale Biotinylierung des TSHR-Fusionsproteins, das ein funktionales Fragment des vollständigen natürlichen TSH-Rezeptors enthält, auch bei einer Expression in tierischen Zellen (HeLa-Zellen) gewährleistet. Der neue Fusionsrezeptor TSHR-BIO konnte unter Verwendung des Vaccinia-Virus-Expressionssystems exprimiert werden. HeLa-Zellen, die mit dem rekombinanten Virus infiziert wurden, erzeugten große Mengen des biotinylierten TSH-Rezeptors in einer Größenordnung von 120.000 Molekülen pro Zelle. Dieser Wert ist um ein bis zwei Größenordnungen größer als die Anzahl von TSH-Rezeptoren in Schilddrüsenzellen und ist vergleichbar mit der Rezeptorzahl der besten bisher bekannten stabil transfizierten Säugetierzellklone. Der unter Verwendung des rekombinanten Vacciniavirus hergestellte Fusionsrezeptor TSHR-BIO erwies sich als vollständig funktional, d.h. er band TSH

- 35 -

mit einer Dissoziationskonstanten K_d von $2,2 \pm 0,1 \times 10^{-10}$ M. Das exprimierte Protein war mit hoher Effizienz biotinyliert, und wenigstens 80 % des rekombinanten Rezeptors TSHR-BIO wurden an Streptavidin gebunden. Der an Streptavidin-Agarose immobilisierte TSHR-BIO-Rezeptor wurde zum Nachweis von die TSH-Bindung an den TSH-Rezeptor der Schilddrüse inhibierenden Immunglobulinen in unfraktionierten Seren verwendet. Es bestand eine hohe positive Korrelation zwischen den bei diesem Assay erhaltenen Ergebnissen und den mit dem kommerziell erhältlichen TRAK Assay® (Brahms Diagnostica GmbH) erhaltenen Ergebnissen, der mit einem solubilisierten porcinen TSH-Rezeptor arbeitet ($r = 0,85$; $P < 0,0001$, 62 Seren).

Die Ergebnisse zeigen erstmalig einen festphasengebundenen biotinylierten TSH-Rezeptor, der eine Teilsequenz des vollständigen humanen TSH-Rezeptors enthält und bezüglich der Bindung von TSH und von pathologischen Autoantikörpern voll funktional ist, so daß er für ein neues, praktisches Verfahren für die Diagnose von Autoimmun-Hyperthyreose geeignet ist.

Patentansprüche

1. Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von TSH-Rezeptor-
5 Autoantikörpern in einer biologischen Probe,
bei dem man die Probe in einer Reaktionsmischung gleichzeitig
oder nacheinander mit einer TSH-Rezeptor-Präparation sowie
wenigstens einem von (i) einem Kompetitor und (ii) einem Mittel
10 für die Abtrennung des TSH-Rezeptors und der daran gebundenen
Bestandteile der Reaktionsmischung von der flüssigen Phase
umsetzt, wobei einer der genannten Bestandteile der Reaktions-
mischung markiert oder selektiv markierbar ist, und bei dem man
den durch Bindung der zu bestimmenden Autoantikörper und/oder
15 des Kompetitors an die TSH-Rezeptor-Präparation gebildeten
Komplex von der flüssigen Reaktionsmischung abtrennt und aus
der Menge der Markierung in dem genannten Komplex auf die
Anwesenheit und/oder Menge der zu bestimmenden Autoantikörper
zurückrechnet,
- 20 **dadurch gekennzeichnet, daß** man als TSH-Rezeptor-Präparation
eine Präparation eines rekombinanten TSH-Fusionsrezeptors
verwendet, der gegenüber einem funktionalen TSH-Rezeptor um
einen Peptidrest verlängert ist, wobei dieser Peptidrest (i)
eine Markierung aufweist oder selektiv markierbar ist und/oder
25 (ii) durch Bindung an einen selektiven Bindungspartner
immobilisiert oder immobilisierbar ist, ohne daß die für den
Rezeptorbindungsassay erforderliche Funktionalität des TSH-
Rezeptors signifikant beeinträchtigt ist.
- 30 2. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß der Peptidrest eine Länge von bis zu 600 Amino-
säuren, insbesondere von 6 bis 200 Aminosäuren, aufweist.
3. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 2, dadurch gekenn-
35 zeichnet, daß der Peptidrest ein C-terminaler Peptidrest ist.
4. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 3,

- 37 -

dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Bindungspartner ein Metallchelatharz, ein Antikörper oder ein Bindungspartner eines der Bindungspaare Biotin/Avidin oder Biotin/Streptavidin ist.

5 5. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Peptidrest wenigstens einen Peptidrestabschnitt enthält, der ausgewählt ist aus dem sogenannten FLAG-Oktapeptid und einem 6His-Peptid, und daß der immobilisierte selektive Bindungspartner ein selektiver Antikörper gegen das
10 FLAG-Oktapeptid oder ein mit dem 6His-Peptid reagierendes Metallchelatharz ist.

15 6. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallchelatharz Ni-NTA-Agarose ist.

15 7. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Peptidrest eine posttranslational biotinylierte Aminosäuresequenz eines Biotin-Enzyms umfaßt.

20 8. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die posttranslational biotinylierte Aminosäuresequenz eines Biotin-Enzyms die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit einer prokaryontischen Acetyl-CoA-Carboxylase ist.

25 9. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Bindungspartner Streptavidin-Agarose ist.

30 10. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der selektive Bindungspartner an eine Mikrofestphase gebunden oder als Beschichtung eines Teströhrchens oder einer Mikrotiterplatte vorliegt.

35 11. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der rekombinante TSH-Fusionsrezeptor durch Expression der cDNA eines funktionalen humanen TSH-

- 38 -

Rezeptors, die um eine für den Peptidrest codierende DNA-Sequenz verlängert und in das Genom eines rekombinanten Vacciniavirus inseriert war, in mit dem rekombinanten Vacciniavirus infizierten Warmblüterzellen hergestellt wurde.

5

12. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Warmblüterzellen HeLa-Zellen sind.

10

13. Rezeptorbindungsassay nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die zu bestimmenden Autoantikörper rezeptorstimulierende Autoantikörper sind, deren Auftreten in einem Humanserum für den Morbus Basedow charakteristisch ist.

15

14. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor, der die Aminosäuresequenz eines funktionalen humanen TSH-Rezeptors aufweist, die um einen Peptidrest verlängert ist, der markiert oder markierbar und/oder immobilisiert oder immobilisierbar ist, ohne daß die Bindungsfähigkeit des TSH-Rezeptors gegenüber TSH oder TSH-Rezeptor-Autoantikörpern beeinträchtigt ist.

20

15. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er an seinem C-Terminus einen Peptidrest aufweist, der wenigstens das FLAG-Oktapeptid und/oder einen 6His-Peptidrest enthält.

25

16. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er an seinem C-Terminus einen Peptidrest in Form einer posttranslational biotinylierbaren Aminosäuresequenz einer Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit eines Biotin-Enzyms enthält.

30

17. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die posttranslational biotinylierbare Aminosäuresequenz die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit einer prokaryontischen Acetyl-CoA-Carboxylase ist.

35

- 39 -

18. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß er an seinem C-Terminus nur um das FLAG-Oktapeptid und einen benachbarten endständigen 6His-Peptidrest verlängert ist.

5

19. Rekombinanter TSH-Fusionsrezeptor nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß er durch Expression einer cDNA-Sequenz eines funktionalen humanen TSH-Rezeptors, die um eine für den Peptidrest codierende DNA-Sequenz verlängert ist und in das Genom eines rekombinanten Vacciniavirus inseriert ist, in mit dem rekombinanten Vacciniavirus infizierten Warmblüterzellen, insbesondere HeLa-Zellen, hergestellt wurde.

10

15

20. Vacciniavirus, in dessen Genom am Ort des Thymidinkinasegens eine DNA-Sequenz exprimierbar inseriert ist, die für den humanen TSH-Rezeptor sowie einen diesen verlängernden Peptidrest codiert.

20

21. Vacciniavirus nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Peptidrest codierende DNA für das FLAG-Oktapeptid sowie einen C-terminalen 6His-Peptidrest codiert.

25

22. Vacciniavirus nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die für den Peptidrest kodierende DNA eine für eine posttranslational biotinylierbare Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit eines prokaryontischen Biotin-Enzyms, insbesondere für die 87 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne der Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein-Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase von E. coli, kodierende cDNA ist.

30

23. Rezeptorbindungsassay zur Bestimmung von physiologisch wirksamen Analyten in Form von Hormonen oder Autoantikörpern, die in einem Organismus durch Wechselwirkung mit einem zellmembranständigen G-Protein-gekoppelten Glykoproteinrezeptor die normalen physiologischen Hormonwirkungen auslösen oder diese blockieren, in einer biologischen Probe, bei dem man die Probe,

35

- 40 -

die den zu bestimmenden Analyten enthält, in einer Reaktionsmischung gleichzeitig oder nacheinander mit einer Präparation des betreffenden Rezeptors sowie wenigstens einem von (i) einem Kompetitor und (ii) einem Binder für den Analyten oder den Rezeptor umsetzt, wobei einer der genannten Bestandteile der Reaktionsmischung markiert oder selektiv markierbar ist, und bei dem man die durch Bindung des Analyten und/oder des Kompetitors an die Rezeptorpräparation gebildeten Komplexe vom Rest der Reaktionsmischung abtrennt und aus der Menge der Markierung in dem genannten Komplex auf die Anwesenheit und/oder Menge des zu bestimmenden Analyten in der Probe zurückrechnet,

dadurch gekennzeichnet, daß man als Rezeptorpräparation eine durch Rekombinationsverfahren hergestellte funktionale Fusionsrezeptor-Präparation verwendet, die aus einem Fusionsrezeptor besteht oder einen solchen Fusionsrezeptor enthält, der gegenüber dem natürlich vorkommenden Rezeptor um einen C-terminalen Peptidrest verlängert ist, wobei der Peptidrest (i) eine Markierung aufweist oder selektiv markierbar ist und/oder (ii) durch Bindung an einen immobilisierten selektiven Bindungspartner immobilisiert oder immobilisierbar ist, ohne daß die für den Rezeptorbindungsassay wesentliche Rezeptorfunktionalität beeinträchtigt ist.

24. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor ausgewählt ist aus rekombinanten FSH- oder LH/CG-Rezeptoren und der Peptidrest bis zu etwa 60 Aminosäuren umfaßt.

25. Rezeptorbindungsassay nach Anspruch 24, daß der Peptidrest wenigstens einen Peptidrestabschnitt enthält, der ausgewählt ist aus dem FLAG-Oktapeptid und einem 6His-Peptid, und daß der immobilisierte selektive Bindungspartner ein selektiver Antikörper gegen das FLAG-Oktapeptid oder ein mit dem 6His-Peptid reagierendes Metallchelatharz, insbesondere Ni-NTA-Agarose, ist.

- 41 -

26. Reagenziensatz zur Durchführung eines Rezeptorbindungsassays nach einem der Ansprüche 1 bis 13 bzw. 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß er, neben weiteren üblichen Komponenten eines entsprechenden Reagenziensatzes, Teströhrchen umfaßt, deren Wände beschichtet sind entweder mit (i) einem Metallchelatharz, an das über einen geeigneten Peptidrest ein funktionaler rekombinanter Fusionsrezeptor, insbesondere ein rekombinanter TSH-Fusions-Rezeptor nach einem der Ansprüche 15, 18 oder 19 gebunden ist, oder (ii) Streptavidin-Agarose, an die ein rekombinanter TSH-Fusions-Rezeptor nach einem der Ansprüche 16, 17 oder 19 gebunden ist.

27. Reagenziensatz nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Metallchelatharz Ni-NTA-Agarose ist und der Peptidrest einen endständigen 6His-Peptidrest enthält.